

IDENTIFIKASI LUPEOL, ASETIL LUPEOL DAN LUPEIL β -HIDROKSIOKTADÉKANOAT YANG TERDAPAT DIDALAM FRAKSI NON-POLAR *AMSONIA GRANDIFLORA* (Fam. APOCYNACEAE)

Subagus Wahyuono
Lab. Fitokimia, Fakultas Farmasi UGM Yogyakarta

ABSTRAK

Sebagai kelanjutan penelitian mengenai kandungan kimia dari tanaman *Amsonia grandiflora*, telah diisolasi tiga senyawa dari sari non-polar dari sari diklormetana tanaman tersebut. Ketiga senyawa tersebut merupakan senyawa triterpena yang mempunyai kerangka lupan dan diidentifikasi sebagai Lupeol, asetil lupeol dan lupeil β -hidroksioktadékanat. Identifikasi senyawa didasarkan atas data spektra (ir, ms, nmr), dan perbandingan langsung dengan lupeol baku.

Kata kunci : *Amsonia grandiflora*, Apocynaceae, lupeol, asetil lupeol dan lupeil β -hidroksioktadékanat

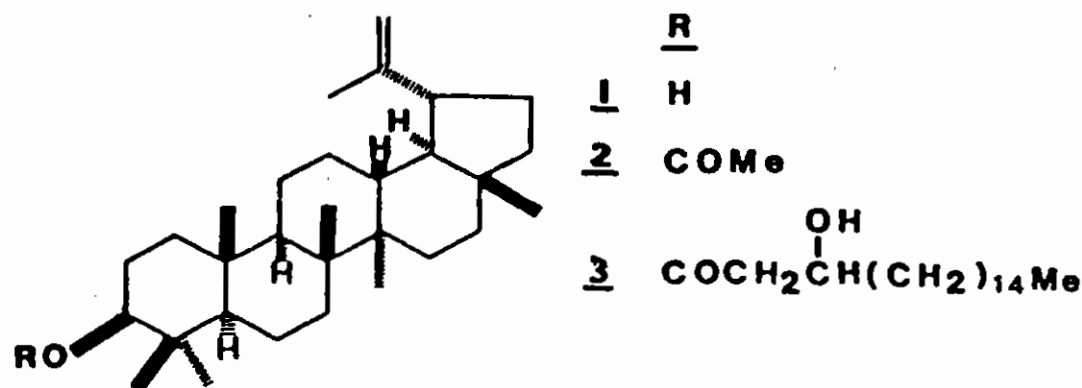
ABSTRACT

A phytochemical investigation on the non-polar fraction of *Amsonia grandiflora* has been done. A triterpene compound of lupane skeleton and its derivatives were isolated. These compounds were identified as lupeol, acetyl lupeol and lupeol β -hydroxyoctadecanoate based on their chemical and physical data (ir, ms, nmr), and direct comparison with authentic lupeol.

Key words: *Amsonia grandiflora*, Apocynaceae, lupeol, acetyl lupeol and lupeol β -hydroxyoctadecanoate

PENDAHULUAN

Telah dilakukan identifikasi 2 buah triterpena asam (asam betulinat dan oleanolat) yang terdapat didalam sari diklormetana tanaman *Amsonia grandiflora*, Fam. Apocynaceae yang tidak larut didalam n-heksana (Wahyuono, 1993). Didalam makalah ini akan diuraikan identifikasi tiga senyawa yang terdapat didalam fraksi non-polar (sari diklormetana yang larut didalam n-heksana). Berdasarkan atas data fisika, kimia dan perbandingan dengan senyawa baku, maka senyawa tersebut diidentifikasi sebagai lupeol (1), asetil lupeol (2) dan lupeil β -hidroksioktadékanat (3).



CARA PENELITIAN

Bahan

Bahan tanaman yang diteliti sama dengan bahan tanaman yang dipakai pada penelitian terdahulu (Wahyuono, 1993), tetapi fraksi yang dikerjakan disini adalah fraksi non-polar (sari diklormetana yang larut dalam *n*-heksana).

Alat

Alat terpakai didalam isolasi, analisis dan identifikasi senyawa disini sama dengan alat terpakai pada penelitian terdahulu (Wahyuono, 1993).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Fraksinasi dan isolasi senyawa

a. fraksinasi

Bahan kering yang telah diserbuk (10,35 kg) disari dengan diklormetana (8 L) dengan ekstraktor tipe Lloyd. Sari diklormetana dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, dan menghasilkan residu sebanyak 0,59 kg. Sebagian dari sari ini (0,248 g) disari dengan *n*-heksana, menghasilkan sari larut dalam *n*-heksana sebanyak 109,8 g. Kemudian sari ini di sari kembali dengan aseton menghasilkan sari tidak larut dalam aseton (endapan) dan sari yang larut dalam aseton (60 g) yang pemisahan kedua sari ini dilakukan dengan sentrifugasi (15.000 rpm, selama 10 menit pada temperatur 10⁰ C).

Lima puluh satu gram sari larut dalam aseton difraksinasi oleh kromatografi kolom dengan fasa diam silika gel 60 (E. Merck, 1,3 kg) dan fasa gerak *n*-heksana dan etil asetat yang proporsinya ditambah menurut kebutuhan. Dua belas fraksi (a' 1 liter) dapat dikumpulkan yang kemudian digabung berdasarkan atas kromatogram dari Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Fraksi nomor 4-6 berisi 2 senyawa utama (2 dan 3) [*n*-heksana:etil asetat (100:10 v/v)] dan fraksi nomor 7-9 berisi 1 senyawa utama (1) menurut kromatogram KLT [*n*-heksana:etil asetat (100:25 v/v)] dengan penampak bercak [Cerium (IV) sulfat dalam asam sulfat encer].

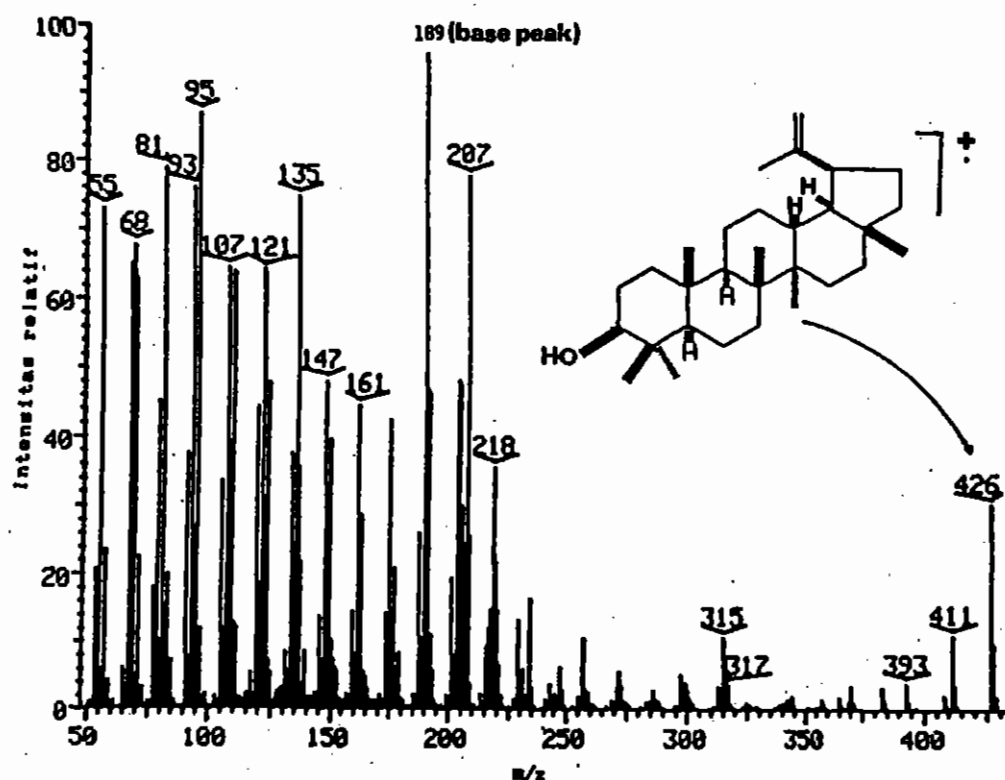
b. Isolasi senyawa 1

Fraksi 7-9 berisi satu senyawa utama (**1**) berdasarkan kromatogram KLT. Senyawa **1** diisolasi dengan preparatif KLT [*n*-heksana:etil asetat (100:25 v/v)] dari sebagian dari fraksi ini (0,5 g). Senyawa **1** yang diperoleh dikristalkan dengan aseton kering menghasilkan 0,45 g kristal berbentuk jarum yang tidak berwarna. Derivat trimetilsilil **1** memberi satu puncak tunggal dalam kromatografi gas dengan retensi waktu 8,1 menit.

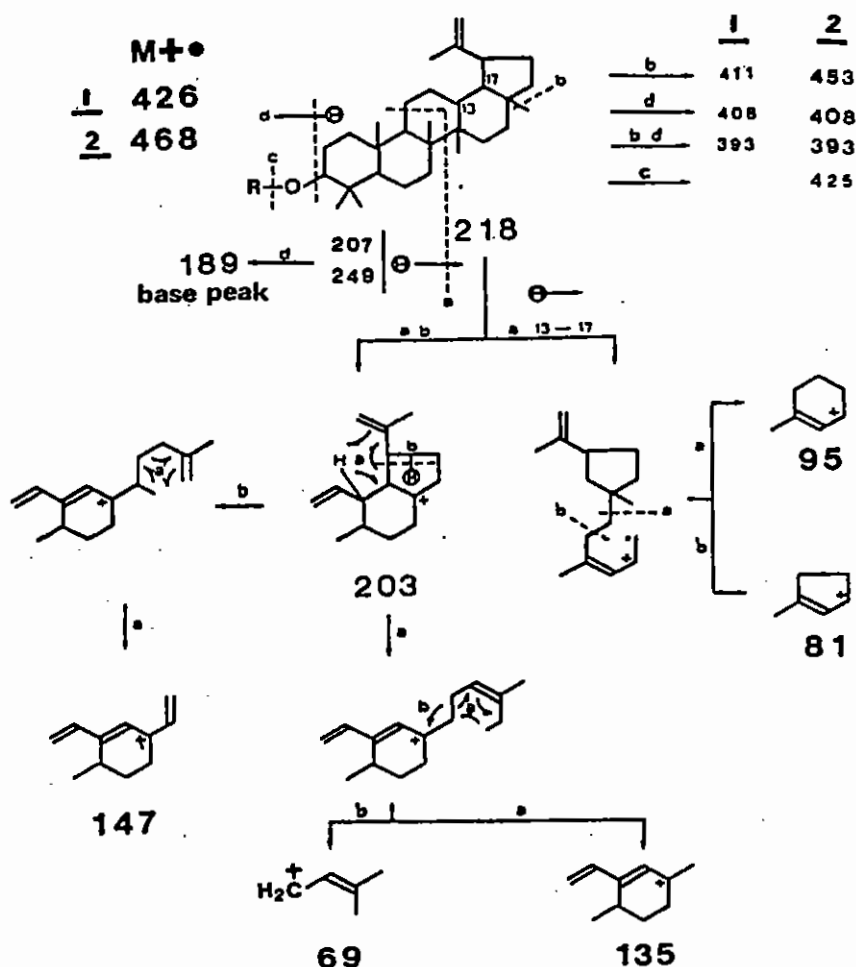
c. Isolasi senyawa 2 dan 3

Fraksi 4-6 berisi dua senyawa utama (**2** dan **3**) berdasarkan atas kromatogram KLT. Dua gram dari fraksi ini difraksinasi dengan kolom kromatografi dengan fasa diam silika gel 60 (60 g) dengan *n*-heksana dan etil asetat yang dinaikkan proporsinya (0% - 6%). Delapan puluh dua fraksi (masing-masing 25 ml) dikumpulkan dan digabung berdasarkan atas kromatogram KLT.

Fraksi 11-49 berisi senyawa **2** komponen utamanya yang dapat dimurnikan dengan cara preparatif KLT [*n*-heksana:etil asetat (100:10 v/v), dikembangkan 2 kali]. Kristalisasi dengan aseton menghasilkan kristal amorf tidak berwarna yang dalam gas kromatografi memberi satu puncak dengan retensi waktu 8,8 menit.



Gambar 1. Resolusi rendah electron impact spektrum massa (Low resolution sim) Lupeol (**1**)



Gambar 2. Pola sebitan ion-ion utama (rasio m/z) spektrum massa Lupeol (1) dan Asetil lupeol (2)

Fraksi 50-82 berisi senyawa 3 sebagai komponen utamanya. Senyawa 3 diisolasi dari fraksi ini (0.78 g) dengan preparatif KLT dengan fasa gerak n-heksana:etil asetat (100:7 v/v) dan dikembangkan dua kali. Senyawa 3 dalam diklormetana dapat diendapkan dengan penambahan metanol. Endapan yang berbentuk amorf putih disaring dan dikeringkan, kemudian diuji kemurniannya secara KLT dengan berbagai fasa gerak yang mana hanya terlihat bercak tunggal [bensena:kloroform (1:1 v/v), $r_f=0,60$; diklormetana 100%, $r_f=0,72$ dan petroleum eter:eter (90:10 v/v), $r_f=0,65$].

Identifikasi senyawa

a. Identifikasi 1

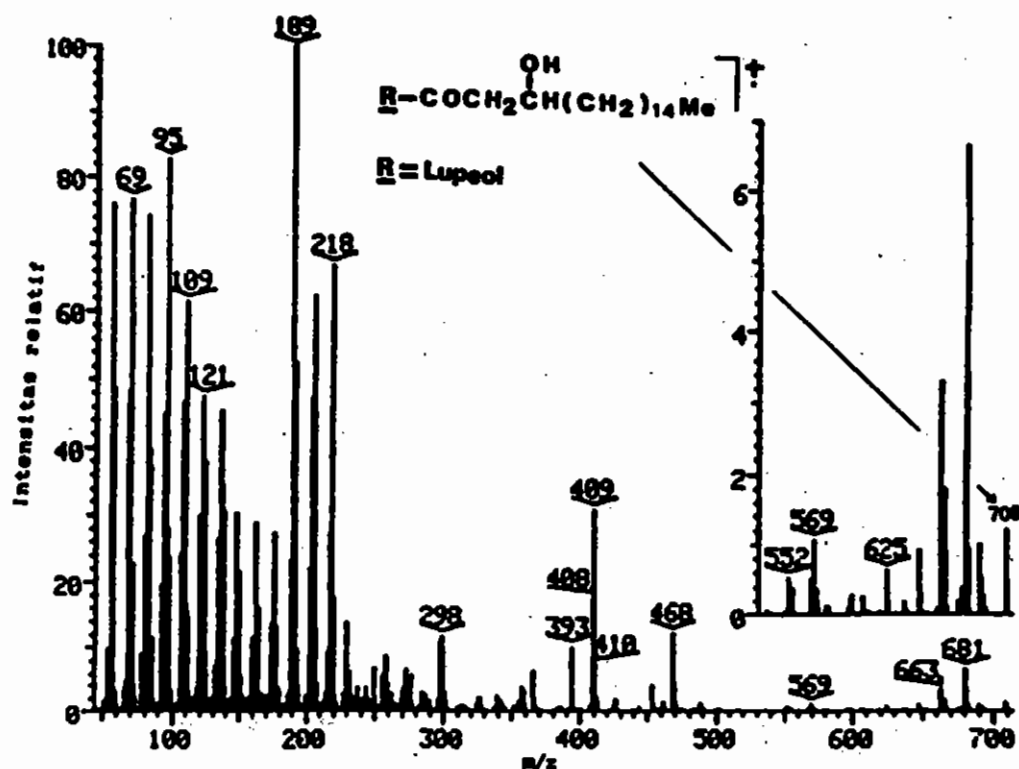
Kristal 1 mempunyai titik lebur 214°C dan $[\alpha]_D^{25} +24,60^{\circ}$ (kloroform; c, 0,42). Berdasarkan atas spektrum inframerah 1 (KBr), senyawa 1 diperkirakan sebagai senyawa

triterpenoida yang mempunyai kerangka luan yang mana spektrum ir **1** menyerupai spektrum inframerah dari asam betulinat, kecuali spektrum ir **1** tanpa gugus karbonil ($-C=O$).

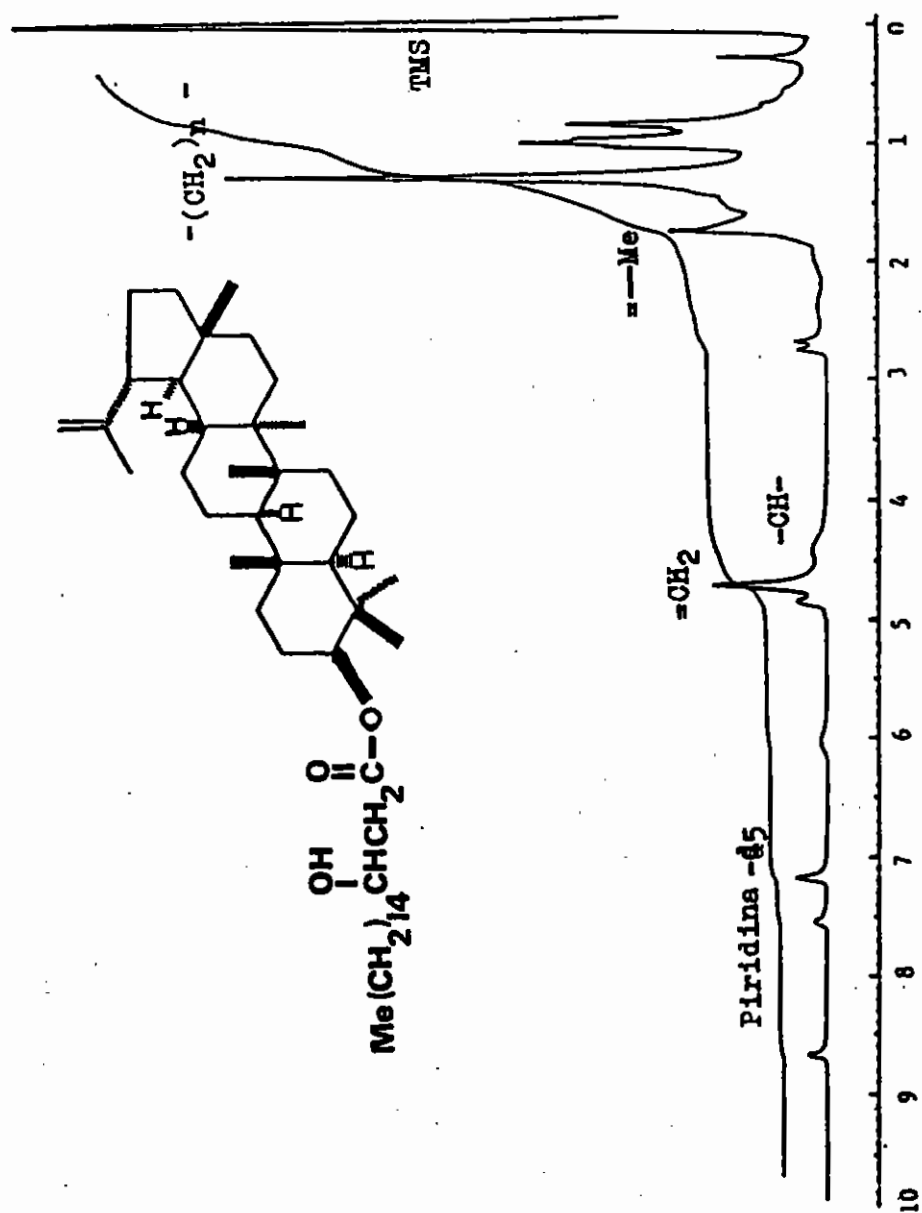
Spektrum massa **1** (Gambar 1) menunjukkan pola fragmentasi (Gambar 2) sama dengan spektrum massa asam betulinat (Wahyuono, 1993). Spektrum massa **1** mempunyai puncak ion molekul (molecular ion peak) pada m/z 426 dan puncak dasar (base peak) pada m/z 189 yang terakhir ini karakteristik untuk triterpen dengan kerangka luan (Ogunkoya, 1981).

Spektrum nuklir magnetik inti (Nuclear Magnetic Resonance/nmr) dari **1** (Kloroform- d) menunjukkan bahwa **1** mempunyai 50 proton diantaranya 6 metil tersier pada pergeseran kimia antara δ 1,03 dan 0,76 ppm serta 1 metil olefinik pada δ 1,68 ppm. Dua proton olefinik mempunyai pergeseran kimia pada δ 4,55 dan 4,70 ppm; kemudian pada δ 3,20 ppm (lebar=broad) adalah proton metina yang berubah menjadi δ 4,55 ppm (triplet, $J=7,2$ Hz) bila **1** diasetilasi (piridina dan anhidrida asam asetat). Hal ini menerangkan bahwa **1** mempunyai konfigurasi α -H dan β -OH pada karbon nomor 3 seperti yang dipunyai oleh asam betulinat.

Analisis karbon hidrogen (tercatat: C=84,74 dan H=11,80; terhitung: C=84,50 dan H=11,70), bobot molekul (spektrum massa) dan jumlah proton (spektrum nmr) dari senyawa **1** memberi indikasi bahwa rumus molekul senyawa **1** sebagai $C_{30}H_{50}O$. Berdasarkan atas data ir, ms dan nmr tersebut diatas, **1** diperkirakan sebagai lupeol. Perbandingan secara langsung antara **1** dengan senyawa baku lupeol hasil isolasi dari tanaman *Asclepias subulata* oleh Dr. Shivanand D. Jolad (1985) dengan metoda pengukuran titik lebur campuran, kokromatografi, dan perbandingan spektra (ir, ms dan nmr) maka **1** disimpulkan sebagai lupeol.



Gambar 2. Resolusi rendah electron impact spektrum massa (Low resolution sim) Lupeol β -hidroksioktadekanat (**2**)

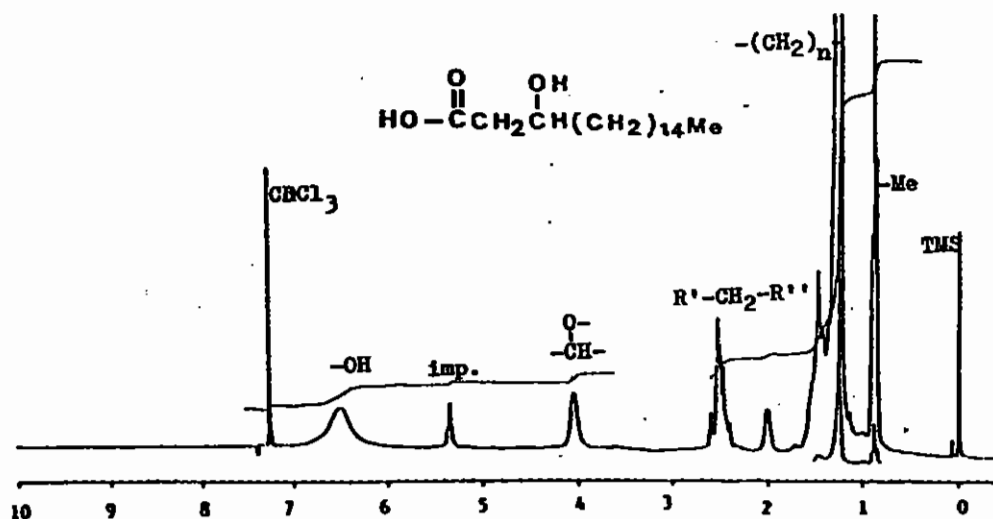


Gambar 4. Spektrum nuklir magnetik resonansi (Piridina- d_5) (90 Mhz) dari Lupeol β -hidroksioktadekanoat (3)

b. Identifikasi 2

Senyawa **2** merupakan kristal berbentuk jarum yang tidak berwarna, mempunyai titik lebur 209°C dan $[\alpha]_D^{25} +41^{\circ}$ (Kloroform; $c=0,43$). Spektrum inframerah (KBr) dari **2** menunjukkan karakteristik serapan dari -C-H tidak jenuh (3080 cm^{-1}), ester (1725 cm^{-1}), -C=C- (1645 cm^{-1}), *gem*-dimetil (doublet, $1388\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$), metilena ujung (885 cm^{-1}) dan -C=O (gugus asetil, 1245 cm^{-1}) (Nakanishi, 1966). Berdasarkan atas data spektra massa dan inframerah, senyawa **2** diduga sebagai senyawa triterpena yang mempunyai kerangka lupan dan mempunyai gugus asetil. Spektrum nmr **2** menerangkan adanya 2 proton metilena ujung (2 singlet; δ 4,58 dan 4,70 ppm), 1 proton metina (triplet; δ 4,55 ppm; $J=7,2\text{ Hz}$), 1 metil vinilik (singlet; δ 1,68 ppm) dan 6 buah metil antara δ 1,03 dan 0,80 ppm.

Perbandingan langsung senyawa **2** dengan senyawa **1** terasetilasi (piridina dan anhidrida asam asetat) menunjukkan bahwa kedua senyawa tersebut tidak berbeda dalam percobaan titik lebur campuran, kokromatografi (warna dan harga rf. sama) dan kesamaan spektra (ir, ms dan nmr). Dengan demikian senyawa **2** disimpulkan sebagai asetil lupeol.



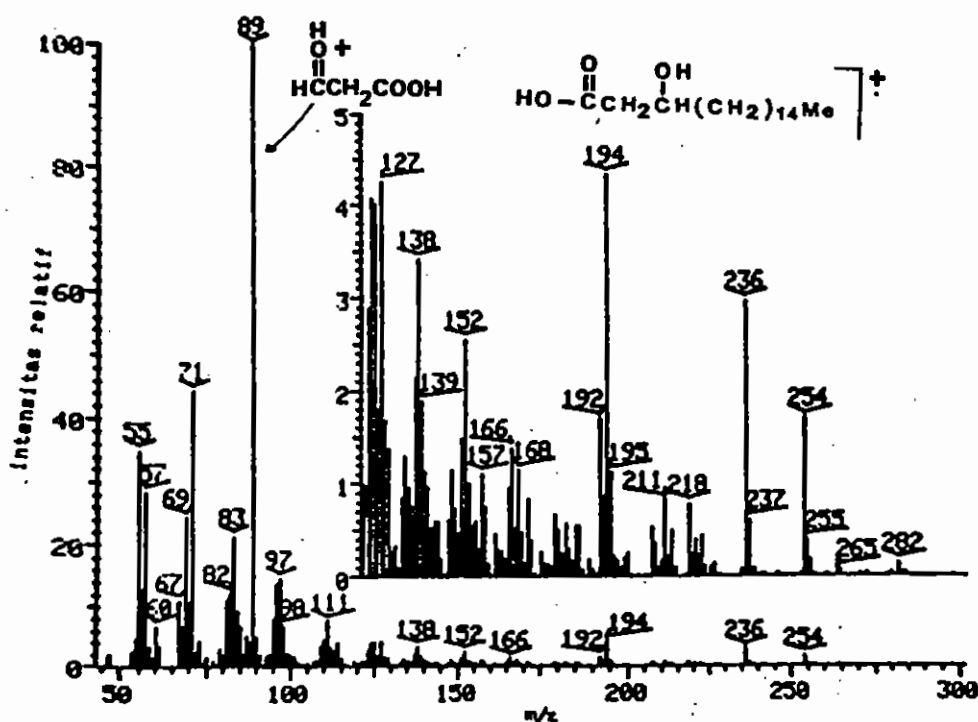
Gambar 5. Spektrum nuklir magnetik resonansi (Kloroform-d) (250 Mhz) dari asam β -hidroksioktadekanat (**3b**)

c. Identifikasi 3

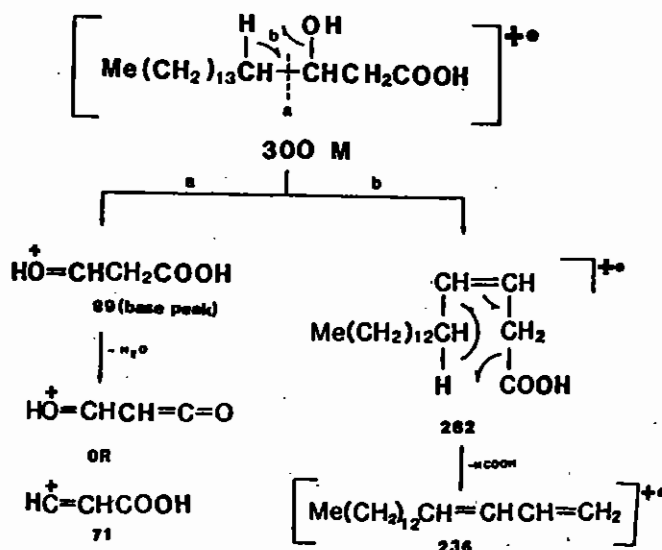
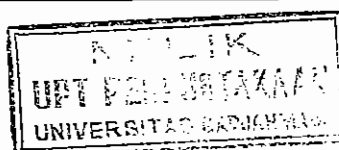
Senyawa **3** berbentuk serbuk amorf berwarna putih yang mempunyai titik lebur 71°C dan $[\alpha]_D^{25} +22,98^\circ$ (kloroform; $c=0,97$). Spektrum inframerah senyawa **3** (KBr) menunjukkan serapan pada 3460 (lebar, gugus -OH), 3080 (=C-H), 1735 (-COOR), 1640 (-C=C-) dan 880 cm^{-1} (metilen ujung). Electron impact spektrum massa (eims)(Gambar 3) dari **3** mempunyai puncak ion molekuler pada m/z 708 ($M^{+\cdot}$) dan menunjukkan puncak-puncak yang karakteristik untuk triterpena kerangka lupan seperti m/z 218, 203, 202 dan 189 (puncak dasar). Puncak-puncak ini juga terdapat pada spektrum massa **1** (lupeol) dan **2** (asetil lupeol), hal ini dapat diartikan bahwa senyawa **3** mempunyai kesamaan kerangka dasar dengan lupeol dan asetil lupeol.

Nuklir magnetik resonansi senyawa **3** (piridina- d_5)(Gambar 4) menunjukkan adanya metilena ujung (δ , 4,69 ppm), satu proton metina (δ , 4,45 ppm; multiplet), dan dua proton metilena (δ , 2,73 ppm, dublet). Satu metil vinilik tampak pada δ 1,73 ppm (singlet) dan integrasi yang besar tampak pada δ 1,26 ppm yang menginformasikan adanya rantai metilena pada **3**. Sedangkan pada δ 1,01-0,82 ppm terdapat 7 buah metil grup.

Berdasarkan atas data spektra ir, ms dan nmr, senyawa **3** diduga sebagai suatu ester dari senyawa hidrokarbon rantai panjang dengan suatu triterpen yang mempunyai kerangka lupan. Hidrolisis **3** dengan 5% KOH metanolik menghasilkan suatu senyawa alkohol (**3a**) dan suatu asam karboksilat (**3b**).



Gambar 3. Resolusi rendah electron impact spektrum massa (Low resolution eims) asam β -Hidroksioktadekanat (**3b**)



Gambar 2. Pola sebaran ion-ion utama (rasio m/z) spektrum massa asam β -hidroksioktadekanoat (**3b**)

Senyawa **3a** dapat dikristalkan dengan aseton sebagai kristal berbentuk jarum yang tidak berwarna dengan titik lebur 213°C dan $[\alpha]_D^{25} +25,2^\circ$ (kloroform; c, 0,43). Berdasarkan atas data spektra [ir, ms (m/z 426, M^+) dan nmr] dari **3a**, senyawa **3a** diperkirakan sebagai lupeol. Perbandingan secara langsung (pengukuran titik lebur campuran dan kokromatografi) antara **3a** dengan **1** mengkonfirmasi senyawa **3a** sebagai lupeol.

Senyawa **3b** merupakan serpihan yang tidak berwarna pada kristalisasi dengan campuran eter dan petroleum eter sama banyak dan mempunyai titik lebur 71°C serta $[\alpha]_D^{25} -13,8^\circ$ (kloroform; c, 1,25). Spektrum inframerah **3b** menunjukkan karakteristik serapan gugus asam karboksilat (3300-2500 cm^{-1} , lebar), -OH bebas (3400 cm^{-1} , sempit), -C=O (1690 cm^{-1}). Rantai panjang gugus metilena menunjukkan serapan pada 2925, 2850, 1470 dan 720 cm^{-1} . Spektrum nuklir magnetik resonansi **3b** (kloroform-d)(Gambar 5) menunjukkan adanya satu

proton metina (α gugus -OH, 4,00 ppm), satu metil (triplet, δ 0,88 ppm) dan satu puncak dengan integrasi 24 proton (δ , 1,24 ppm). Selanjutnya, terlihat dublet-dublet pada δ 2,52 ppm ($J=16$ dan 4 Hz) dan pada δ 2,41 ppm ($J=16$ dan 8,5 Hz) dalam bentuk sistem AB, yang mana karakteristik dari dua proton yang tidak ekuivalen dan berdekatan langsung dengan gugus $-C=O$ (Herz dkk., 1976). Dua proton dari gugus -OH dan -COOH muncul bersama melebar pada δ 6,50 ppm. Puncak ekstra pada δ 5,3 dan 2,0 ppm adalah kontaminan yang dapat dibuktikan dengan data kromatografi gas, dimana **3h** sebagai senyawa utama mempunyai retensi waktu 13,2 menit sedangkan kontaminan (14% dari **3h**) mempunyai retensi waktu 14,0 menit.

Spektrum massa **3h** (Gambar 6) tidak menunjukkan puncak ion molekul, tetapi fragmen dengan massa paling tinggi (m/z 282) terjadi karena kehilangan 1 molekul air (Gambar 7). Fragmen yang juga penting adalah m/z 255 ($M^+ - COOH$), 254 ($M^+ - HCOOH$), 194 dan 89 (puncak dasar). Berdasarkan atas data spektra ir, ms dan mmr, **3h** diidentifikasi sebagai asam β -hidroksioktadekanoat. Spektrum massa resolusi tinggi (hrms) untuk m/z 89 sebagai $C_3H_5O_3$ lebih jauh memperkuat dugaan bahwa gugus -OH terdapat pada posisi .

Ester dari asam β -hidroksioktadekanoat dengan suatu diterpena telah dilaporkan oleh Herz dkk. (1976) terdapat pada tanaman *Eupatorium hyssopifolium*. Keberadaan asam hidroksioktadekanoat bebas dan lupeol bebas telah dilaporkan oleh Pitcher dkk. (1984) terdapat dalam tanaman *Centaurea aspera*. Tetapi keberadaan ester lupeol β -hidroksioktadekanoat dialam adalah pertama kali dilaporkan ketika penelitian ini dilakukan.

KESIMPULAN

Didalam sari non-polar dari tanaman *A. grandiflora* terdapat senyawa lupeol dan derivatnya, antara lain derivat asetil dan derivat β -hidroksioktadekanoil derivatnya. Derivat yang terakhir ini merupakan senyawa ester baru dalam walaupun senyawa penyusunnya telah lama diketahui dan diisolasi dari bahan alam. Identifikasi ketiga senyawa tersebut dilakukan secara spektroskopi dan perbandingan dengan senyawa baku untuk lupeol.

DAFTAR PUSTAKA

- Herz, W., dan R. P. Sharma (1976), Phytochemical study of *Eupatorium hyssopifolium*, *J. Org. Chem.*, 41(6), 1015
- Jolad, Shivanand D. (1985), *Tidak dipublikasikan*
- Nakanishi, K. (1966), *Infrared Absorption Spectroscopy Practical*, Holden Day, San Fransisco
- Ogunkoya, L. (1981), Application of Mass spectrometry in structural problems in triterpenes, *Phytochemistry*, 20, 121-126
- Pitcher, M. Teresa, Eliseo Seoane, Amparo Tortajada (1984), Triterpenoid compounds present in *Centaurea aspera*, *Journal of Natural Product*, 47(1), 184-185
- Wahyuono, S. (1993), Identifikasi dua asam triterpen yang terdapat didalam *Amsonia grandiflora*, fam. Apocynaceae, *Majalah Farmasi Indonesia*, 4(2), 44-54